

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/08/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL A
FTALATOS E NANOPLÁSTICOS: IMPACTO SOBRE
DESENVOLVIMENTO GONADAL MASCULINO**

MIRELLA FRANCO MOREIRA

Botucatu – SP

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL A
FTALATOS E NANOPLÁSTICOS: IMPACTO SOBRE
DESENVOLVIMENTO GONADAL MASCULINO**

MIRELLA FRANCO MOREIRA

Orientador: Prof. Titular Wellerson Rodrigo Scarano

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular,
Estrutural e Funcional

Wellerson Rodrigo Scarano

**Botucatu – SP
2025**

M838e Moreira, Mirella Franco
EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL A
FTALATOS E NANOPLÁSTICOS: IMPACTO SOBRE
DESENVOLVIMENTO GONADAL MASCULINO /
Mirella Franco Moreira. -- Botucatu, 2026
78 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

1. desenvolvimento fetal. 2. exposição materna. 3.
ftalatos. 4. nanoplásticos. 5. testículo. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa:

A onipresença dos nanoplásticos, sobretudo quando associados a aditivos químicos como os ftalatos, representa um desafio emergente tanto para o meio ambiente quanto para a saúde pública. Evidências demonstram que esses poluentes são capazes de atravessar a barreira placentária, alcançando o feto e potencialmente comprometendo o desenvolvimento saudável da prole. Entre os principais efeitos, destacam-se alterações na função hormonal e na saúde reprodutiva masculina, o que desperta grande preocupação diante do aumento progressivo das taxas de infertilidade observadas globalmente nas últimas décadas.

Nesse cenário, compreender os impactos da exposição *in utero* e durante a lactação a uma mistura de ftalatos e nanoplásticos sobre o desenvolvimento testicular dos descendentes faz-se necessário. Assim, os resultados desta pesquisa contribuem de forma inédita para a literatura sobre coexposição a ftalatos e nanoplásticos, oferecendo evidências científicas dos efeitos na reprodução masculina em diferentes períodos da vida. Mais do que ampliar o conhecimento acadêmico, os achados têm o potencial de gerar subsídios para a formulação de políticas públicas voltadas à redução de sua produção, ao incentivo de práticas de consumo e descarte responsáveis e à promoção de ações educativas voltadas à conscientização da sociedade, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, especialmente o ODS 3 (saúde e bem-estar) e o ODS 12 (consumo e produção responsáveis), em direção a um futuro mais sustentável, seguro e comprometido com a saúde humana e suas gerações.

Potential impact of this research:

The ubiquity of nanoplastics, especially when combined with chemical additives such as phthalates, poses an emerging challenge for both the environment and public health. Evidence shows that these pollutants can cross the placental barrier, reaching the fetus and potentially compromising the healthy development of offspring. Among the main effects are alterations in hormonal function and male reproductive health, which raises great concern given the progressive increase in infertility rates observed globally in recent decades.

In this context, understanding the impacts of *in utero* and lactation exposure to a mixture of phthalates and nanoplastics on the testicular development of offspring is essential. Thus, the results of this research contribute in an unprecedented way to the literature on co-exposure to phthalates and nanoplastics, offering scientific evidence of the effects on male reproduction at different stages of life. More than expanding academic knowledge, the findings have the

potential to generate subsidies for the formulation of public policies aimed at reducing its production, encouraging responsible consumption and disposal practices, and promoting educational actions aimed at raising awareness in society, aligning with the UN Sustainable Development Goals, especially SDG 3 (health and well-being) and SDG 12 (responsible consumption and production), towards a more sustainable, safe future that is committed to human health and its generations.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Exposição Intrauterina e Lactacional a Ftalatos e Nanoplásticos: impacto sobre desenvolvimento gonadal masculino

AUTORA: MIRELLA FRANCO MOREIRA

ORIENTADOR: WELLERSON RODRIGO SCARANO

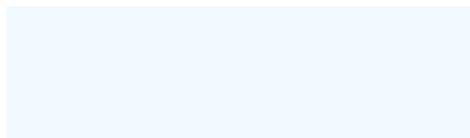
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia Celular Estrutural e Funcional pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WELLERSON RODRIGO SCARANO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Profa. Dra. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Profa. Dra. JULIANA ELAINE PEROBELLI (Participação Virtual)
Depto. Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Botucatu, 20 de fevereiro de 2026.



Renan Codeco da Silva
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu
Rua Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, 18618689
<https://www.ibb.unesp.br/#!/ensino/pos-graduacao/programas-stricto-sensu/pg-biologia-geral-e-aplicada/> - CNPJ: 48031918002259.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** por me guiar pelos melhores caminhos, e por me conceder resiliência, sabedoria e todas as bênçãos que recebo.

Agradeço à minha família. À minha mãe, **Cláudia Franco** (*in memoriam*), por ter dedicado sua vida a mim e às minhas irmãs, oferecendo amparo, incentivo e amor, por nunca me deixar desistir dos meus sonhos e, principalmente, pela educação, herança mais preciosa que carrego e que me permitiu alcançar voos mais altos. Ao meu pai, **José Mário Moreira**, por todo suporte e incentivo, pelos momentos descontraídos e por estar presente nos períodos mais difíceis. Às minhas irmãs, **Larissa** e **Giovanna**, por serem meu suporte diário, minha fonte de inspiração e força, por não me deixarem desistir e por caminharem comigo em todos os momentos. Ao meu namorado, **Arthur Noronha**, por ser meu companheiro em todas as horas, por vibrar genuinamente pelas minhas conquistas, me apoiar, aconselhar e devolver alegria e leveza aos meus dias. Atribuo minhas conquistas à minha família; sem vocês, eu não seria nem teria nada do que sou e conquistei. Amo vocês.

Ao meu orientador, **Wellerson Scarano**, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de desenvolver uma pesquisa tão relevante. Sou grata por me permitir atuar em um laboratório estruturado, pela disponibilidade em dialogar e por sempre acolher ideias.

Aos membros do **LabDECA**, agradeço pela dedicação a este trabalho, pelo companheirismo e por compartilharem seus conhecimentos. Em especial, agradeço aos meus amigos de laboratório e de vida, à **Natália Magosso**, por se colocar sempre à disposição com entusiasmo para ensinar, pela sua sensibilidade, pelas conversas que enriquecem os dias no laboratório e pelo grande incentivo e carinho constantes. Ao **Patrick Vieira**, pelos ensinamentos, entusiasmo, risadas, apoio e por tornar a rotina no laboratório mais leve, alegre e com muita ciência, sempre enxergando o melhor em todos. À **Isabela Ferreira** pela amizade e confiança em coorientar sua iniciação científica, ensinar e aprender com você foi uma experiência muito especial. À **Victoria Pinha** e à **Isabela Favaro**, pela amizade e pelas contribuições à pesquisa. Agradeço por me acolherem desde o início, por serem meu suporte em Botucatu e tornar os dias mais animados e de muita pesquisa.

Aos amigos do departamento, em especial, ao **Matheus Fioretto** pelos grandes aprendizados, pela atenção dedicada aos nossos resultados, pelos questionamentos pertinentes e pelo incentivo constante à reflexão científica. À **Luísa Annibal**, pelo incentivo, amizade e carinho dentro e fora do laboratório.

À minha psicóloga, **Kamylla Arantes**, por estar presente nos dois anos mais difíceis da minha vida, por não me deixar desistir, por me acolher, fortalecer e ensinar a olhar para mim com mais carinho. Obrigada pelos conselhos, pelo cuidado e por insistir em mim.

À **Andressa Jacinto** por ser uma roommate tão especial, por estar sempre disposta a conversar, rir e sair comigo, além de estar ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

À minha amiga da graduação, **Maysa Cavalcante**, por ser minha parceira de conversas, desabafos e risadas, por compreender minhas angústias e torcer genuinamente por mim. Às minhas amigas do ensino médio, **Maria Júlia Bastos**, **Júlia Lazarini** e **Vitória Freitas**, por permanecerem presentes mesmo com a vida acontecendo. Levo comigo com carinho os momentos bons da adolescência que vivi ao lado de vocês.

A todos os técnicos administrativos e funcionários da UNESP, em especial do Departamento de Morfologia, com destaque para **Keila Emílio**, **Ricardo Teixeira** e **José Eduardo**, pela disponibilidade e atenção em auxiliar. À **Paula**, responsável pela limpeza do departamento, pelo cuidado e paciência, mesmo diante da rotina do laboratório.

Aos **animais de laboratório**, expressei minha gratidão e respeito, reconhecendo sua contribuição para a realização deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** e ao **Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo 2024/03207-0 e 2024/02800-9, agradeço o apoio financeiro durante a realização do mestrado.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABP: proteína ligadora de androgênio	GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
AGD: anogenital distance	GD: gestacional day
AMH: anti-mullerian hormone	GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas
AR: androgen receptor	GP-x: glutathione peroxidase
BBzP: ftalato de benzila butila	GR: glutathione reductase
BHT: barreira hematotesticular	GSH: reduced glutathione
BTB: blood-testis barrier	GSSG: oxidized glutathione
BW: body weight	GST: glutathione S-transferase
CAT: catalase	HE: hematoxylin-eosin
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais	HHG: hipotálamo-hipófise-gônada
CL: célula de Leydig	HS17B1: hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 1
CLF: célula de Leydig fetal	IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	INSL3: insulina-3
CS: célula de Sertoli	LC: Leydig cell
CTRL: controle	LH: hormônio luteinizante
DAG: distância anogenital	MDA: malondialdehyde
DBP: di-n-butila ftalato	MEHP: mono-(2-etilhexil) ftalato
DEHP: bis(2-etilhexil)ftalato	MF: mistura de ftalatos
DEP: dietilftalato	MNPS: micro nanoplásticos
DEs: desreguladores endócrinos	MPs: microplásticos
DG: dia gestacional	Mt: milhões de toneladas
DHT: diidrotestosterona	NPs: nanoplásticos
DiBP: ftalato de diisobutil	OCLN: occludin
DiNP: ftalato de diisononila	ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
DOHaD: Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença	PM: phthalate mixture
DPN: dia pós-natal	PS: preputial separation
ERO: espécies reativas de oxigênio	
FSH: hormônio folículo-estimulante	

PND: Postnatal day	TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances
ROS: reactive oxygen species	TG: total glutathione
SC: Sertoli cell	TGFB2: transforming growth factor beta
SOD: superoxide dismutase	2
SRD5A1: steroid 5-alpha-reductase	TJP1: tight junction protein 1
StAR: proteína reguladora aguda esteroidogênica	

CAPÍTULO I

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo do conceito DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), demonstrando como exposições precoces durante a gestação, incluindo fatores metabólicos, nutricionais, hormonais e ambientais, como nanoplásticos e ftalatos provenientes de diferentes fontes de contaminação, podem induzir modificações epigenéticas. Essas alterações epigenéticas podem programar o desenvolvimento ao longo da vida, resultando em desfechos que variam de um desenvolvimento saudável até alterações hormonais e prejuízos na fertilidade masculina. 20
- Figura 2.** Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas, as análises e a composição da mistura de ftalatos (MF). Imagem criada em BioRender.com. 26
- Figura 3.** Efeito da exposição gestacional à uma mistura de ftalatos e nanoplástico em ratos descendentes no DG 20 sobre os níveis relativos de mRNA em genes do desenvolvimento e maturação testicular e em genes da via esteroidogênica. **(a)** Hormônio anti-mulleriano (Amh). **(b)** Insulina-3 (Ins13) **(c)** Receptor de andrógeno (Ar). **(d)** 17-beta desidrogenase 1 (Hsd17b1). **(e)** Steroid 5 alpha-reductase 1 (Srd5a1). **(f)** Aromatase (Cyp19a1). A expressão gênica é dada pela quantificação de $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados foram analisados por ANOVA quando paramétricos, seguido pelo teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis quando não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn e os valores foram expressos como média $\pm$ DP; n = 4-6/grupo e significativos quando *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, ***P $\leq$ 0,001..... 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeito da exposição aos poluentes plásticos no peso corporal (n = 8–10/grupo), peso testicular absoluto (n = 7–8/grupo), peso testicular relativo (n = 7–8/grupo) e na distância anogenital absoluta (n = 8–10/grupo) e ajustada (n = 8–10/grupo) em descendentes no período fetal. Os dados foram analisados por ANOVA quando paramétricos, seguido pelo teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis quando não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn e os valores foram expressos como média $\pm$ DP; e significativos quando *P $\leq$ 0,05..... 28

CAPÍTULO II

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. The experimental design includes the treatment protocol, experimental groups, administered doses, and the composition of the phthalate mixture (PM). Pregnant Sprague Dawley rats received daily oral treatment from gestational day 10 (GD10) until postnatal day 21 (PND21). Animals were randomly assigned to six groups: CTRL (control group), vehicle (corn oil/water); T1, 20 µg/kg/day of PM; T2, 200 mg/kg/day of PM; T3, 1 mg/kg/day of 100 nm nanoplastics (NPs); T4, 20 µg/kg/day of PM + 1 mg/kg/day of NPs; and T5, 200 mg/kg/day of PM + 1 mg/kg/day of NPs. At the end of the lactation period (PND21), male offspring were euthanized at two time points—PND22 (prepubertal) and PND120 (adult). Testes were collected for histological and molecular analyses, as well as evaluation of the oxidative profile. 47

Figure 2. Measurement of anogenital distance on PND1 and 22 and monitoring of prepuce separation age in male offspring. (a) Anogenital distance on PND1 (n = 8/group). (b) Anogenital distance on PND 22 (n = 8–10/group). (c) Age of preputial separation (n = 7–9/group). Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; and significant when *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01. 55

Figure 3. Quantification of the mean number of spermatocytes in the pachytene stage in seminiferous tubules of rats on PND22. (a) Representative photomicrograph of seminiferous tubules with pachytene spermatocytes undergoing apoptosis in the T5 group, highlighted by the arrow. (b) Quantification of the mean number of pachytene spermatocytes undergoing apoptosis per tubule on PND22 (n = 6–7/group). Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; and significant when *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01. 56

Figure 4. (a, b) Representative photomicrograph of the control group testis in stage IX of spermatogenesis, stained with hematoxylin and eosin. The four diameter measurements are indicated in black dashed lines, while the four germinal epithelium height measurements are indicated in solid gray lines. Objective 20x (a) and 40x (b). Abbreviations: i - interstitium; lu - lumen; ge - germinal epithelium; st - seminiferous tubule; Sc - Sertoli cell; Lc - Leydig cell. (c) Mean diameter of the seminiferous tubule (µm). (d) Mean height of the germinative epithelium (µm). (e) Quantification of the mean number of Sertoli cells per tubule. (f) Quantification of the mean number of Leydig cells. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; (n = 4–7/group) and significant when *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001. 57

Figure 5. Histopathological analysis of seminiferous tubules. (a) Graph showing the percentage of vacuolization in the seminiferous tubule. (b) Graph showing the percentage of immature germ cells in the tubule lumen. Representative photomicrographs of histopathological findings at 200x magnification. (c) Vacuolization ►(arrow). (d) Germ cells in the seminiferous tubule lumen (circle). (e) Presence of acidophilic cells ↑(arrow). (f) Degeneration of the germinative epithelium. Values are expressed as mean ± standard deviation (n=5/group). ANOVA followed by Tukey's post-test. Significant when *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Abbreviations: i- interstitium, ge- germinative epithelium, lu- lumen. 58

Figure 6. Effect of gestational and lactational exposure to a mixture of phthalates and nanoplastics in offspring rats on PND22 on relative mRNA levels in genes involved in testicular development and maturation and the steroidogenic pathway. (a) Anti-Müllerian hormone (*Amh*). (b) Insulin-3 (*Ins13*). (c) Androgen receptor (*Ar*). (d) 17-beta dehydrogenase 1 (*Hsd17b1*). (e) Aromatase (*Cyp19a1*). (f) Steroid 5 alpha-reductase 1 (*Srd5a1*). Gene expression is given by the quantification of $2^{-\Delta\Delta CT}$ and data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; n = 4–5/group and significant when *P ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, and ****P ≤ 0.0001. 59

Figure 7. Late effect (PND120) of gestational and lactational exposure to a mixture of phthalates and nanoplastics in rat offspring on relative mRNA levels in genes of the blood-testis barrier junction and in the growth factor gene. (a) Occludin (Ocln). (b) Tight junction protein 1 (Tjp1). (c) Transforming growth factor beta 2 (Tgfβ2). Gene expression is given by the quantification of $2^{-\Delta\Delta CT}$ and data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; n = 4–5/group; and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01. 60

Figure 8. Oxidative stress analysis on postnatal days 22 and 120. (a) Superoxide dismutase on PND 22. (b) Catalase on PND 22. (c) Thiobarbituric acid reactive substances on PND 22. (d) Total glutathione on PND 22. (e) Oxidized glutathione on PND 22. (f) Reduced glutathione on PND 22. (g) Glutathione S-transferase on PND 22. (h) Superoxide dismutase at PND 120. (i) Catalase on PND 120. (j) Thiobarbituric acid reactive substances at PND 120. (k) Total glutathione on PND 120. (l) Oxidized glutathione on PND 120. (m) Reduced glutathione on PND 120. (n) Glutathione S-Transferase on PND 120. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; (n = 4–5/group/age); and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01, ***P $\leq$ 0.001, and ****P $\leq$ 0.0001. 62

LISTA DE TABELAS

Table 1. Effect of exposure to plastic pollutants on body weight and absolute testicular weight at PND22 (n = 7–9/group) and PND120 (n= 7–9/group) in male offspring rats. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01. 53

APPENDIX

Table 1. Sequence of the primers used for the RT-qPCR analysis, containing the access codes of the analyzed targets (GenBank). 77

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - ALTERAÇÕES TESTICULARES EM FETOS MACHOS EXPOSTOS A MISTURA DE FALATOS E NANOPLÁSTICOS NO PERÍODO INTRAUTERINO	13
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 O testículo e o desenvolvimento testicular	15
1.2. Desreguladores endócrinos e DOHaD	18
1.3. Os micro/nanoplásticos e os ftalatos	20
1. OBJETIVO	24
2.1. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Delineamento experimental	24
3.2. Justificativa da dose	26
3.3. Análise molecular – RT-qPCR	26
3.4. Análise estatística	27
1. RESULTADOS	27
4.1. Peso corporal, peso testicular e distância anogenital	27
4.2. Análise molecular por RT-qPCR	28
2. DISCUSSÃO	29
3. CONCLUSÃO	32
4. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II - Artigo “DEVELOPMENTAL EFFECTS OF INTRAUTERINE AND LACTATIONAL EXPOSURE TO NANOPLASTICS AND PHTHALATES ON RAT TESTIS”	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUCTION	42
2. MATERIAL AND METHODS	44
2.1. Chemicals	44
2.2. Animals and experimental design	45
2.3. Dose justification	47
2.4. External physical signs of the onset of puberty	48
2.5. Light microscopy and morphometric analysis	48
2.6. Evaluation of the oxidative profile	49
2.6.1. Lipoperoxidation	50
2.6.2. Superoxide dismutase activity	50
2.6.3. Catalase activity	50

2.6.4. Glutathione.....	50
2.7. Gene Expression by RT-qPCR.....	51
2.8. Plasma hormone levels	52
2.9. Statistical analysis	53
3. RESULTS	53
3.1. Body and testicular weight.....	53
3.2. Anogenital distance and prepuce separation	55
Anogenital distance (AGD) was measured and adjusted for body weight on PND1 and PND22. On PND1, an increase in AGD was observed in the T3 group compared to the CTRL group (Fig. 2a). On PND22, there was an increase in AGD in the T3 and T4 groups compared to the CTRL group (Fig. 2b). Furthermore, a delay in the occurrence of preputial separation was observed in the T3 group compared to the CTRL group (Fig. 2c).	
3.3. Analysis of apoptosis in spermatocytes in pachytene in prepuberty (PND22)	55
3.4. Histological and morphometrical analysis in adulthood (PND120)	56
3.5. Histopathological analyses (PND120).....	57
3.6. Gene expression in prepuberty (PND22)	58
3.7. Gene expression in adulthood (PND120).....	59
3.8. Analysis of the oxidative profile (PND22 and 120)	60
3.9. Plasma testosterone levels	63
4. DISCUSSION.....	63
5. CONCLUSION	68
6. REFERENCES	70
CONCLUSÃO GERAL	76
APPENDIX.....	77
APPENDIX 1: List of primers used in RT-qPCR	77
APPENDIX 2: CEUA Certificate.....	78

CAPÍTULO I - ALTERAÇÕES TESTICULARES EM FETOS MACHOS EXPOSTOS A MISTURA DE FTALATOS E NANOPLÁSTICOS NO PERÍODO INTRAUTERINO

RESUMO

O desenvolvimento testicular depende de interações hormonais e celulares que regulam a diferenciação, maturação e funcionalidade da gônada. Alterações neste processo durante o período fetal podem repercutir a longo prazo na espermatogênese e na esteroidogênese. A crescente produção e utilização de plásticos tem levantado preocupações devido aos impactos ambientais e de saúde associados. No ambiente, os plásticos são degradados em micro e nanoplásticos (MNPS), partículas pequenas que tem a capacidade de adsorver compostos lipofílicos, como os ftalatos, caracterizados como desreguladores endócrinos (DEs). No entanto, os efeitos da coexposição a nanoplásticos (NPs) e ftalatos, resíduos da degradação do plástico, sobre o desenvolvimento reprodutivo masculino são poucos compreendidos. Este estudo investigou o impacto da exposição gestacional a uma mistura de ftalatos (MF) e NPs, isoladamente ou combinados, em parâmetros biométricos e de expressão gênica testicular de fetos machos descendentes. Ratas prenhes Sprague-Dawley foram distribuídas em seis grupos: controle (CTRL), T1 (20 µg/kg/dia – MF), T2 (200 mg/kg/dia – MF), T3 (1 mg/kg/dia – NPs, 100 nm), T4 (20 µg/kg/dia – MF + 1 mg/kg/dia – NPs) e T5 (200 mg/kg/dia – MF + 1 mg/kg/dia – NPs), tratadas por via oral do dia gestacional 5 ao 20. A MF utilizada neste estudo foi baseada nas concentrações dos principais metabólitos detectados na urina de gestantes, refletindo um cenário realista de exposição humana. A menor dose da MF representa uma concentração ambientalmente relevante, enquanto a maior corresponde a uma dose que extrapola a exposição diária com o intuito de comparação com trabalhos que consideram a exposição de ftalatos únicos. Já a concentração de NPs empregada foi escolhida por representar uma exposição ambientalmente relevante. Os resultados indicaram redução do peso corporal em T5 e diminuição da distância anogenital em T3. Em nível molecular, T4 apresentou aumento da expressão de *Amh*, *Insl3*, *Ar*, *Srd5a1* e *Cyp19a1*, além de elevação adicional de *Ar* em T5 e redução de *Hsd17b1* em T1. Esses achados sugerem que a coexposição gestacional a ftalatos e NPs, especialmente em T4, modula genes envolvidos na diferenciação e na via esteroidogênica, possivelmente afetando o desenvolvimento testicular fetal e indicando efeitos sinérgicos entre os contaminantes.

Palavras-chave: desenvolvimento fetal; exposição materna; ftalatos; nanoplásticos; testículo.

ABSTRACT

Testicular development depends on hormonal and cellular interactions that regulate gonadal differentiation, maturation, and functionality. Alterations in this process during the fetal period can have long-term repercussions on spermatogenesis and steroidogenesis. The increasing production and use of plastics has raised concerns due to the associated environmental and health impacts. In the environment, plastics degrade into micro- and nanoplastics (MNPs), small particles that have the ability to adsorb lipophilic compounds, such as phthalates, characterized as endocrine disruptors (EDs). However, the effects of co-exposure to nanoplastics (NPs) and phthalates, residues of plastic degradation, on male reproductive development are poorly understood. This study investigated the impact of gestational exposure to a mixture of phthalates (MF) and NPs, alone or in combination, on biometric parameters and testicular gene expression in male offspring. Pregnant Sprague-Dawley rats were divided into six groups: control (CTRL), T1 (20 µg/kg/day – MF), T2 (200 mg/kg/day – MF), T3 (1 mg/kg/day – NPs, 100 nm), T4 (20 µg/kg/day – MF + 1 mg/kg/day – NPs), and T5 (200 mg/kg/day – MF + 1 mg/kg/day – NPs), treated orally from gestational day 5 to 20. The MF used in this study was based on the concentrations of the main metabolites detected in the urine of pregnant rats, reflecting a realistic scenario of human exposure. The lowest dose of the MF represents an environmentally relevant concentration, while the highest corresponds to a dose that exceeds daily exposure for comparison with studies that consider exposure to single phthalates. The concentration of NPs used was chosen because it represents an environmentally relevant exposure. The results indicated a reduction in body weight at T5 and a decrease in anogenital distance at T3. At the molecular level, T4 showed increased expression of *Amh*, *Insl3*, *Ar*, *Srd5a1*, and *Cyp19a1*, in addition to a further increase in *Ar* at T5 and a reduction in *Hsd17b1* at T1. These findings suggest that gestational co-exposure to phthalates and NPs, especially at T4, modulates genes involved in differentiation and the steroidogenic pathway, possibly affecting fetal testicular development and indicating synergistic effects between the contaminants.

Keywords: Fetal development; maternal exposure; nanoplastics; phthalates; testis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O testículo e o desenvolvimento testicular

Os testículos, localizados no escroto, são envolvidos pela túnica albugínea, uma cápsula de tecido conjuntivo denso que projeta septos para o interior do órgão, delimitando lóbulos que abrigam os túbulos seminíferos e convergem para o mediastino testicular (Lin *et al.*, 2025). Sua função é anficrina, exercendo simultaneamente a produção de gametas e a síntese de hormônios, destacando, assim, a importância desse órgão para o desenvolvimento reprodutivo masculino e fertilidade (Li *et al.*, 2024).

Do ponto de vista morfológico, os testículos são organizados em dois compartimentos: tubular e intertubular (ou intersticial). O compartimento tubular é composto pelos túbulos seminíferos, onde se localizam as células germinativas em diferentes estágios do processo espermatogênico, bem como as células somáticas de suporte, denominadas células de Sertoli (CS). Enquanto o compartimento intersticial é composto predominantemente pelas células de Leydig (CL), células mioídes (que circundam os túbulos seminíferos), vasos sanguíneos, linfáticos, terminações nervosas e uma população de células variável constituída principalmente de macrófagos, fibroblastos e mastócitos (Heinrich; Defalco, 2019).

As CS são imprescindíveis para o desenvolvimento gonadal e sobrevivência das espermatogônias, por meio de hormônios e fatores de crescimento, como o hormônio anti-Mülleriano (AMH). O AMH promove a diferenciação sexual masculina, induzindo a regressão dos ductos paramesonéfricos e contribuem para o funcionamento adequado das gônadas. Ressalta-se a importância do AMH, visto que estudos indicam que alterações em seus níveis estão associados à patogênese dos distúrbios da diferenciação sexual e criptorquidia (Sansone *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2021).

As CS criam um microambiente para a nutrição e maturação das células germinativas, fagocitam aquelas que estão degeneradas, e transportam espermátides maduras para o lúmen dos túbulos seminíferos (Griswold, 2018). Além disso, as CS produzem moléculas de função parácrina e endócrina, como a proteína ligadora de androgênio (ABP), inibina B e o próprio AMH, que estão envolvidas na regulação da espermatogênese (Xiao *et al.*, 2025).

A barreira hematotesticular (BHT) é formada por junções especializadas entre as CS, incluindo junções oclusivas, aderentes e comunicantes (Stanton, 2016). A BHT atua de forma física ao estabelecer uma separação seletiva entre os compartimentos basal e adluminal, de forma fisiológica ao controlar o movimento de substâncias para o lúmen, e de forma imunológica ao expressar fatores imunorreguladores que conferem privilégio imunológico às

células germinativas, protegendo contra a resposta imune e a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mital; Hinton; Dufour, 2011; Kaur; Thompson; Dufour, 2014). Ademais, as CS interagem amplamente com as CL por meio de mecanismos parácrinos que vão regular o desenvolvimento e a esteroidogênese dessas células (Rebourcet *et al.*, 2014).

As CL são a principal fonte de andrógenos nos testículos, dentre os hormônios produzidos, destaca-se a testosterona, o principal hormônio sexual masculino (Smith; Walker, 2014). Esse processo é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG), no qual a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo estimula a adenohipófise a secretar o hormônio luteinizante (LH). O LH, por sua vez, se liga em receptores nas CL, ativando a esteroidogênese — processo no qual o colesterol é utilizado como substrato inicial para a síntese de esteroides. O transporte de colesterol do citosol para a membrana interna depende da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR). A partir disso, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima CYP11A1 e segue por uma via enzimática resultando na síntese de testosterona (Ye *et al.*, 2017).

Os andrógenos produzidos influenciam na modulação das funções das CS, promovendo a diferenciação e maturação das células germinativas na espermatogênese. Além disso, são importantes no desenvolvimento dos derivados do ducto mesonéfrico (epidídimo, ducto deferente e glândula seminal) e da genitália externa, bem como na manutenção das características sexuais secundárias masculinas (Murashima *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2024). Adicionalmente, as CL participam da descida testicular (Virtanen; Toppari, 2014), principalmente através da secreção de fatores como o peptídeo *insulin-like 3* (INSL3), além dos andrógenos (Ivell *et al.*, 2022; O'donnel; Whiley; Loveland, 2022).

Para além da estrutura e função dos testículos na vida adulta, é importante compreender sua origem durante o desenvolvimento embrionário, que estabelece as bases para a organização morfofuncional do órgão. O desenvolvimento dos testículos em mamíferos tem início na fase embrionária, quando as células progenitoras bipotenciais da gônada indiferenciada passam a expressar o gene *Sry* codificado pelo cromossomo Y, o que direciona para a linhagem testicular (Koopman *et al.*, 1990). Em ratos, esse processo ocorre aproximadamente entre o dia gestacional (DG) 12-13, quando se formam os cordões seminíferos primitivos, compostos pelos precursores das CS que circundam as células germinativas primordiais e induzem o desenvolvimento da população de células de Leydig fetais (CLF) (Magre; Jost, 1991). No DG15, as CLF se diferenciam a partir do mesênquima do interstício testicular e iniciam a secreção de testosterona e INSL3, estabelecendo a função endócrina do órgão e incitando o

desenvolvimento dos túbulos e ductos reprodutivos, bem como dos órgãos sexuais masculinos (Rebourcet *et al.*, 2014).

No período neonatal do rato, que compreende do dia pós-natal (DPN) 0 ao DPN7, ocorre a transição dos gonócitos para espermatogônias tipo A com alta taxa mitótica, acompanhada por aumento do índice proliferativo e início da maturação das CS (Huckins; Clermont, 1968; Picut *et al.*, 2014). Na fase pré-puberal (DPN 15-22), as CS secretam fluido que contribui para a formação do lúmen tubular, iniciam o estabelecimento da BHT e se tornam funcionais no final dessa fase, além de cessar a sua proliferação entre os DPNs 15-21. Enquanto isso, as CLF começam a regredir e passar por um processo de diferenciação progressiva, transitando pelas fases de células progenitoras (DPN 10-14) e células de Leydig imaturas (DPN 21-28) (Desjardins, 1978; Orth, 1982; Picut *et al.*, 2014).

Durante o período puberal (DPN 33-55), as células de Leydig adultas são finalmente estabelecidas, completando a transição. Além disso, há a consolidação da espermiogênese funcional, caracterizada pela maturação das espermátides em espermatozoides e pela presença de todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero (Ojeda; Advis; Andrews, 1980; Picut *et al.*, 2014; Stanton, 2016; Ye *et al.*, 2017). Por fim, na idade adulta (>DPN 61), há um crescimento do testículo associado ao aumento do diâmetro tubular e regularidade da espermatogênese (Picut *et al.*, 2014).

Ampliando a perspectiva para os mamíferos de modo geral, observa-se que a maturação do sistema genital masculino segue uma sequência morfológica semelhante entre as espécies. No entanto, o ser humano nasce em um estágio mais avançado de desenvolvimento em comparação ao rato recém-nascido. No que se refere ao desenvolvimento testicular, tanto em ratos quanto em humanos, ocorrem eventos fundamentais em uma mesma ordem — formação dos cordões seminíferos, diferenciação das CS e CL, transformação dos gonócitos em espermatogônias, formação da BHT e início da espermatogênese — porém com diferenças marcantes quanto à temporalidade, ao controle hormonal e ao padrão de maturação (Picut; Ziejewski; Stanislaus, 2017).

Em humanos, o testículo fetal depende das gonadotrofinas (gonadotrofina coriônica humana) e LH para sua maturação desde as fases iniciais da gestação, enquanto nos ratos o desenvolvimento testicular inicial é independente dessas gonadotrofinas, sendo mediado por fatores parácrinos, como o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1). Outra diferença importante é que, em humanos, há um período prolongado de quiescência testicular — entre os 3 e 9 anos de idade — caracterizado por baixa atividade mitótica, enquanto nos ratos essa fase está ausente, e o desenvolvimento testicular ocorre de forma contínua e

161 acelerada após o nascimento. Adicionalmente, eventos como a descida testicular (em condições
162 normais) e o surgimento das espermatogônias ocorrem ainda na vida fetal em humanos, mas
163 somente após o nascimento nos ratos, refletindo a relativa imaturidade do rato ao nascer (Picut;
164 Ziejewski; Stanislaus, 2017).

165 Apesar dessas diferenças, o rato é amplamente utilizado em pesquisas toxicológicas
166 devido ao seu custo relativamente baixo, ciclo reprodutivo curto, facilidade de manejo e
167 disponibilidade em ambientes laboratoriais. Além disso, é amplamente reconhecido que, para
168 avaliar os efeitos de exposições durante períodos críticos de suscetibilidade, a realização de
169 testes *in vivo* é essencial, pois permite captar respostas hormonais integradas e alterações
170 funcionais complexas que não podem ser adequadamente avaliadas em modelos *in vitro* (Auger
171 *et al.*, 2014). Essas características, somadas ao vasto conhecimento acumulado sobre a
172 anatomia, fisiologia e desenvolvimento testicular em ratos, consolidam esse animal como um
173 modelo experimental eficaz para a detecção precoce de lesões testiculares e efeitos
174 toxicológicos. Ainda assim, é fundamental considerar as limitações inerentes à extrapolação
175 direta dos achados para humanos, exigindo cautela na interpretação dos resultados (Picut;
176 Ziejewski; Stanislaus, 2017).

177 Ademais, é importante destacar que o desenvolvimento adequado dos testículos em
178 mamíferos até a idade adulta depende de uma série de processos hormonais e celulares inter-
179 relacionados, tornando o órgão altamente suscetível a perturbações, o que pode comprometer
180 etapas críticas da diferenciação e maturação testicular, além de impactar a funcionalidade das
181 CS e CL. Como consequência, há um aumento do risco para o surgimento de anormalidades e
182 distúrbios reprodutivos em curto, médio e longo prazo (Li; Spade, 2021).

183 As perturbações podem ter origem de uma combinação de fatores genéticos, hormonais,
184 ambientais e relacionados ao estilo de vida (Elamo; Virtanen; Toppari, 2022). Entretanto,
185 acredita-se que os fatores ambientais estão diretamente envolvidos nas taxas crescentes desses
186 distúrbios, sendo os desreguladores do sistema endócrino frequentemente apontados como
187 potenciais causadores (Kilcoyne; Mitchell, 2019).

189 1.2. Desreguladores endócrinos e DOHaD

190 Os desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias ou misturas químicas, naturais ou
191 sintéticas, que alteram o funcionamento do sistema endócrino e, consequentemente, induzem
192 efeitos adversos em um determinado organismo ou na sua descendência (Yoon *et al.*, 2014). A
193 ação dos DEs pode ocorrer de diversas maneiras, como ligar-se aos receptores hormonais e

mimetizar ou bloquear a ação de hormônios endógenos, como os estrógenos e andrógenos. Sua toxicidade pode interferir nos mecanismos homeostáticos hormonais normais que promovem o crescimento, a resposta imunológica e a reprodução nos tecidos e órgãos específicos (Ullah *et al.*, 2023). Essas substâncias também podem interferir no ciclo celular, nos processos apoptóticos e na regulação epigenética (Birnbaum, 2013; Skakkebaek *et al.*, 2016).

Além da exposição por contato direto com esses materiais, os DEs também são liberados no meio ambiente, e dessa forma, a exposição humana a eles pode ocorrer por meio da ingestão de alimentos contaminados, o contato com produtos químicos pela pele ou a inalação de partículas pelo sistema respiratório (Yesildemir; Celik, 2024). Como resultado, podem afetar indiretamente embriões/fetos por meio da placenta e neonatos através da amamentação. Portanto, os efeitos adversos não se limitam aos indivíduos diretamente expostos, mas também sobre seus descendentes, afetando seu desenvolvimento pré e pós-natal — períodos considerados janelas críticas e sensíveis do desenvolvimento animal (Ghassabian *et al.*, 2022).

Correlacionado a isso, surge a teoria das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (*Developmental Origins of Health and Disease* - DOHaD) proposta por Barker e colaboradores (1989). A DOHaD propõe que o ambiente no qual um indivíduo se expõe durante o desenvolvimento precoce, pode programar de forma permanente a estrutura e a função de tecidos e órgãos, alterando a susceptibilidade a doenças e distúrbios mais tarde na vida (Rosenfeld, 2015). No entanto, embora essa teoria tenha sido postulada há mais de 25 anos, ainda persistem lacunas importantes, especialmente no que se refere aos mecanismos moleculares e epigenéticos que mediam os efeitos dos DEs no sistema genital. Interações entre ambiente-célula e ambiente-genoma/epigenoma durante o desenvolvimento do sistema genital masculino e feminino continuam sendo objeto de intensa investigação. Por isso, essa linha de pesquisa é essencial para compreender como os insultos precoces podem repercutir negativamente na fertilidade e na saúde reprodutiva ao longo da vida e em gerações subsequentes.

Na literatura, estudos têm mostrado que os DEs estão associados à toxicidade reprodutiva masculina durante a exposição fetal, devido à sua ação estrogênica ou antiandrogênica, que pode desencadear alterações na diferenciação sexual (Jewett *et al.*, 2022). Entre os DEs, evidências apontam que os ftalatos, aditivos do plástico, podem ser responsáveis pela infertilidade e disfunção do testículo, tendo efeitos negativos, como a diminuição da quantidade e da qualidade do esperma, distância anogenital (DAG) reduzida, baixa produção

de testosterona, defeitos congênitos nos órgãos reprodutivos (criptorquidia e hipospádia) e entre outras anomalias que tem aumentado significativamente nas últimas décadas (Foster, 2006; Sifakis *et al.*, 2017; Joensen *et al.*, 2018; Li; Spade, 2021). (Figura 2).

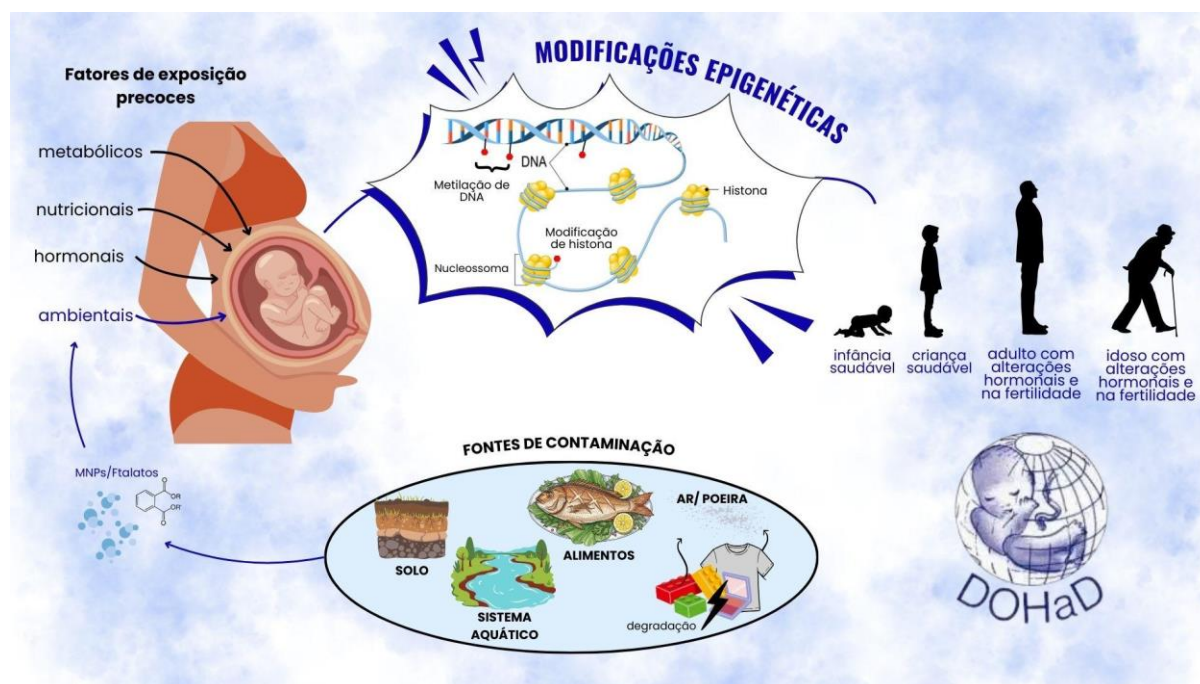


Figura 1. Esquema ilustrativo do conceito DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), demonstrando como exposições precoces durante a gestação, incluindo fatores metabólicos, nutricionais, hormonais e ambientais, como nanoplásticos e ftalatos provenientes de diferentes fontes de contaminação, podem induzir modificações epigenéticas. Essas alterações epigenéticas podem programar o desenvolvimento ao longo da vida, resultando em desfechos que variam de um desenvolvimento saudável até alterações hormonais e prejuízos na fertilidade masculina.

1.3. Os micro/nanoplásticos e os ftalatos

Devido à sua versatilidade, baixo custo e longa durabilidade, os plásticos são amplamente utilizados em uma variedade de produtos, como equipamentos médicos, brinquedos e embalagens de alimentos. Devido a esses fatores, a fabricação de materiais plásticos tem apresentado um crescimento contínuo (North; Halden, 2013; Campanale *et al.*, 2020). Em 2021, a produção mundial de plástico totalizou 390,7 milhões de toneladas (Mt), alcançando uma marca preocupante de 460 Mt em 2023 — um aumento de 17,7% em apenas dois anos (Europe, 2022; ONU, 2023). Estimativas indicam que, se mantido esse ritmo, a produção pode atingir 902 Mt até 2050 (Geyer; Jambeck; Law, 2017).

Apesar da crescente conscientização e dos avanços tecnológicos, as taxas globais de reciclagem permanecem baixas. Atualmente, apenas cerca de 9% é efetivamente reciclado em

escala global, o que se deve a uma combinação de fatores estruturais e comportamentais (OECD, 2022). Entre as principais barreiras estão a falta de infraestrutura adequada para coleta e triagem, o desconhecimento da população sobre como reciclar corretamente, o baixo incentivo econômico para o uso de material reciclado e o custo competitivo do plástico virgem. Além disso, a ausência de políticas públicas eficazes e a inconsistência regulatória entre países dificultam a implementação de sistemas de reciclagem mais eficientes (Dokl *et al.*, 2024). Contudo, o descarte inadequado resulta na sua onipresença e no acúmulo generalizado no meio ambiente, agravando significativamente a poluição por microplásticos (MPs, partículas com diâmetro <5 mm) e nanoplásticos (NPs, diâmetro < 1 μ m) (Song *et al.*, 2017; Costa, 2018). Essa problemática tem despertado a atenção da comunidade científica e da população mundial, diante das possíveis implicações que esses materiais podem ter para a saúde humana (Vethaak; Legler, 2021).

Os micro e nanoplásticos (MNPs) podem ser classificados em dois tipos: detritos plásticos primários e secundários. As partículas plásticas primárias são criadas deliberadamente em tamanhos específicos para diversos fins, como cosméticos e produtos de higiene (por exemplo, esfoliantes e pastas dentais), enquanto os detritos secundários se formam por degradação no ambiente ou durante o uso por abrasão mecânica (Hartmann *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019; Villacorta *et al.*, 2022). Com isso, os MNPs podem variar em tamanho, forma, tipos de polímeros e composições químicas, influenciando no seu transporte e distribuição no ambiente e dentro de organismos (Jaikumar *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020).

Em humanos a exposição aos MNPs ocorre principalmente por ingestão e inalação (Cox *et al.*, 2019; Prata *et al.*, 2020). Recentemente, foi comprovada a presença dessas partículas em seres humanos, tendo sido detectados no sangue e em diferentes órgãos (Amato-lourenço *et al.*, 2021; Ragusa *et al.*, 2021; Jenner *et al.*, 2022; Leslie *et al.*, 2022). Em 2025, um estudo brasileiro identificou 110 partículas de MNPs em amostras placentárias humanas provenientes de 10 gestantes, sendo essas partículas compostas principalmente de polietileno, usado na fabricação de embalagens, e por poliamida, presente em tecidos sintéticos (Oliveira *et al.*, 2025). Esse achado evidencia a capacidade dessas partículas de transpor a barreira placentária, que penetram por meio de mecanismos de transporte ativo e passivo, e reforça a preocupação quanto à toxicidade dos MNPs durante a gravidez, uma vez que o feto pode ser exposto ainda no útero, período em que há maior vulnerabilidade (Tetro *et al.*, 2018; Arumugasaamy *et al.*, 2019).

Além disso, embora a BHT atue como uma defesa para impedir a entrada de agentes citotóxicos no tecido reprodutivo masculino, estudos em ratos e camundongos demonstram que

os MNPs também são capazes de penetrar nos testículos, por meio de endocitose ou absorção, dessa forma, a saúde reprodutiva pode ser afetada tanto diretamente no indivíduo quanto em suas futuras gerações (Wright; Kelly, 2017; Amereh *et al.*, 2020; Jin *et al.*, 2020).

Com base nisso, um estudo conduzido por Amereh e colaboradores (2020) utilizou nanoplasticos com aproximadamente 40 nm em doses variando de 1 a 10 mg/kg/dia para avaliar a sua possível toxicidade reprodutiva e perturbação endócrina. Como resultado, foram identificadas alterações no sistema genital de ratos machos, incluindo redução nos níveis de hormônios como testosterona, LH e hormônio folículo-estimulante (FSH), danos no DNA, alterações na morfologia e viabilidade dos espermatozoides, além de alterações histológicas nos testículos e na expressão de genes associados à espermatogênese e na sinalização HHG, evidenciando que a exposição a partículas de plástico está associada a consequências adversas em mamíferos (Amereh *et al.*, 2020).

Além da toxicidade intrínseca dos MNPs, destaca-se a presença dos ftalatos, substâncias que conferem flexibilidade, brilho e transparência aos plásticos, tornando-os mais atrativos para o mercado e para o consumidor final (Luis *et al.*, 2021). Entretanto, por não estarem covalentemente ligados à estrutura polimérica, essas substâncias conseguem migrar para alimentos, bebidas e outros materiais (Cao, 2009). Consequentemente, os ftalatos têm sido detectados em diversos fluidos biológicos, incluindo o líquido amniótico, o leite e a urina materna (Katsikantami *et al.* 2020; Liu *et al.*, 2024).

Categorizados como desreguladores endócrinos, sabe-se que esses plastificantes podem perturbar o desenvolvimento do sistema genital e a sua fertilidade (Li; Spade, 2021). Em ratos, a exposição pré-natal ao ftalato bis(2-etilhexil)ftalato (DEHP) reduziu os níveis séricos de testosterona e estradiol na prole masculina no DPN60, além de diminuir a expressão gênica de alvos relacionados a esteroidogênese (*StAr*, *Cyp11a1*, *3β-hsd*, *17β-hsd*, *5α-redutase* e *aromatase-Cyp19*) de modo dose-dependente (Sekaran; Jagadeesan, 2015). Também foi documentado que diferentes doses de di-n-butila (DBP) administradas a ratas prenhes resultou em toxicidade no desenvolvimento e na reprodução da prole masculina, incluindo a diminuição da DAG, dano histológico dos testículos e a apoptose celular nos túbulos seminíferos (Ma *et al.*, 2017).

Outro efeito decorrente do ftalato é a indução de estresse oxidativo nos testículos. Essa condição compromete a espermatogênese, levando à apoptose das células germinativas e das CS, além de prejudicar a função das CL, reduzindo os níveis de enzimas esteroidogênicas (Sedha; Kumar; Shukla, 2015). O mesmo mecanismo também foi elucidado recentemente em um estudo realizado com células imaturas de Leydig (TM3) e Sertoli (TM4) de camundongos,

318 expostas ao mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP), o qual demonstrou lesão por estresse oxidativo
319 e a subsequente promoção de apoptose nesses tipos celulares (Wang *et al.*, 2024).

320 Ademais, cabe ressaltar que os efeitos adversos dos ftalatos vão depender de uma série
321 de condições, como o tipo, fase de desenvolvimento no momento da exposição e dosagem
322 (Svechnikov *et al.*, 2010). Além disso, a associação entre MNPs e substâncias químicas
323 dispersas no meio ambiente, incluindo ftalatos, intensifica os efeitos dessas substâncias, devido
324 às suas interações com as partículas em diferentes organismos (Deng *et al.*, 2018).

325 Os estudos toxicológicos acerca desse assunto frequentemente estão voltados para a
326 avaliação dos efeitos dos ftalatos individualmente. No entanto, é fundamental reconhecer que
327 tanto seres humanos quanto animais são expostos a uma mistura de diferentes ftalatos
328 (Ferguson *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2014). Em Illinois, nos Estados Unidos, um estudo
329 avaliou as concentrações de seis principais metabólitos de ftalatos na urina de mulheres
330 grávidas, visando determinar as proporções relativas de diferentes ftalatos aos quais os fetos
331 estavam expostos indiretamente durante a gestação, esses metabólitos incluíram DEHP, DEP
332 (dietilftalato), DBP, DiBP (ftalato de diisobutil), BBzP (ftalato de benzila butila), e DiNP
333 (ftalato de diisononila) (Zhou; Gao; Flaws, 2017).

334 Os dados obtidos por esse grupo de estudo proporcionaram uma representação mais
335 precisa da exposição dos fetos aos ftalatos, uma vez que espelham as situações reais de
336 exposição encontradas na vida cotidiana, fornecendo, portanto, informações sobre a
337 composição da exposição durante o período gestacional e direcionando pesquisas futuras e
338 medidas preventivas relacionadas a esses desreguladores endócrinos.

339 Nesse contexto, apesar da relevância dos estudos toxicológicos sobre a exposição
340 fetal/perinatal aos MNPS e seus resíduos, que representam um desafio para a saúde pública
341 tanto pela sua toxicidade quanto pela sua ampla dispersão, não há dados na literatura que
342 avaliem os efeitos da exposição gestacional a uma combinação de ftalatos e nanoplásticos, em
343 doses ambientalmente relevantes, nos testículos de ratos. Além disso, considerando que as CL
344 e CS são imprescindíveis para o funcionamento adequado dos testículos e da espermatogênese,
345 o presente estudo investigou a hipótese de que a combinação de resíduos plásticos possa
346 impactar as funções dessas células e, conseqüentemente, prejudicar o desenvolvimento do
347 testículo e suas funções.

3. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a coexposição gestacional a ftalatos e nanoplásticos pode modular de forma não linear, ou seja, não dependente da dose, genes relacionados a esteroidogênese e ao desenvolvimento testicular. Estudos futuros devem integrar análises hormonais séricas e proteômicas para confirmar se a superexpressão gênica observada de fato se traduz em maior atividade funcional, além de avaliar as repercussões reprodutivas durante o desenvolvimento pós-natal.

4. REFERÊNCIAS

- AMATO-LOURENÇO, L. F. *et al.* Presence of airborne microplastics in human lung tissue. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 416, p. 126124, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126124>.
- AMEREH, F. The emerging risk of exposure to nano(micro)plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: from a hypothetical scenario to a global public health challenge. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114158, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114158>.
- AN, K. *et al.* Potential Role of Anti-Müllerian Hormone in Regulating Seasonal Reproduction in Animals: The Example of Males. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5874, jan. 2023.
- AQUINO, A. M. *et al.* Integrated transcriptome and proteome analysis indicates potential biomarkers of prostate cancer in offspring of pregnant rats exposed to a phthalate mixture during gestation and lactation. **Chemosphere**, v. 341, p. 140020, nov. 2023.
- ARUMUGASAAMY, N. *et al.* Microphysiological systems of the placental barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 161-162, p. 161-175, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.08.010>
- AUGER, J. *et al.* Integrative rodent models for assessing male reproductive toxicity of environmental endocrine active substances. **Asian Journal Of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 60, 2014. <http://dx.doi.org/10.4103/1008-682x.122366>.
- AZZOUNI, F. *et al.* The 5 Alpha-Reductase Isozyme Family: A Review of Basic Biology and Their Role in Human Diseases. **Advances in Urology**, v. 2012, p. 530121, 2012.
- BARKER, D.J.P I *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577-580, 1989. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90710-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90710-1).
- BIRNBAUM, L. S. State of the Science of Endocrine Disruptors. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 4, 2013. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1306695>.
- CAMPANALE, C *et al.* A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. **International Journal Of Environmental**

597 **Research And Public Health**, v. 17, n. 4, p. 1212, 2020.
 598 <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17041212>.

599 CAO, X. Phthalate Esters in Foods: sources, occurrence, and analytical methods.
 600 **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 21-43, 2009.
 601 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00093.x>.

602 CHAKRABORTY, S.; PRAMANIK, J.; MAHATA, B. Revisiting steroidogenesis and its
 603 role in immune regulation with the advanced tools and technologies. **Genes & Immunity**, v.
 604 22, n. 3, p. 125–140, jul. 2021.

605 COSTA, J. P. Micro- and nanoplastics in the environment: research and policymaking.
 606 **Current Opinion In Environmental Science & Health**, v. 1, p. 12-16, 2018.
 607 <http://dx.doi.org/10.1016/j.coesh.2017.11.002>.

608 COX, K. D. *et al.* Human Consumption of Microplastics. **Environmental Science &**
 609 **Technology**, v. 53, n. 12, p. 7068-7074, 2019.
 610 <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.9b01517>.

611 DENG, Y. *et al.* Evidence that microplastics aggravate the toxicity of organophosphorus
 612 flame retardants in mice (*Mus musculus*). **Journal Of Hazardous Materials**, v. 357, p.
 613 348-354, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.06.017>.

614 DESJARDINS C. Endocrine regulation of reproductive development and function in the
 615 male. **J Anim Sci.** 1978;47 Suppl 2:56-79. PMID: 122449.

616 DOKL, M. *et al.* Global projections of plastic use, end-of-life fate and potential changes in
 617 consumption, reduction, recycling and replacement with bioplastics to 2050. **Sustainable**
 618 **Production And Consumption**, v. 51, p. 498-518, 2024.
 619 <http://dx.doi.org/10.1016/j.spc.2024.09.025>.

620 EDELSZTEIN, N. Y. *et al.* AMH Regulation by Steroids in the Mammalian Testis:
 621 oliveiraUnderlying Mechanisms and Clinical Implications. **Frontiers in Endocrinology**,
 622 v. 13, 31 maio 2022.

623 ELAMO, H. P.; VIRTANEN, H. E.; TOPPARI, J. Genetics of cryptorchidism and
 624 testicular regression. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**,
 625 v. 36, n. 1, p. 101619, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2022.101619>.

626 EMA, M.; MIYAWAKI, E.; KAWASHIMA, K. Further evaluation of developmental
 627 toxicity of di-n-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats.
 628 **Toxicology Letters**, v. 98, n. 1-2, p. 87–93, set. 1998.

629 EUROPE, P. Plastics – the Facts 2022. **Plastic Europe**, n. October, p. 1–81, 2022

630 FERGUSON, K. K. *et al.* Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation
 631 to sex hormones and puberty in boys. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 70-76, 2014.
 632 <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.002>.

633 FOSTER, P. M.D. Disruption of reproductive development in male rat offspring
 634 following in utero exposure to phthalate esters. **International Journal Of Andrology**, v.
 635 29, n. 1, p. 140-147, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00563.x>.

636 FRANÇA, L. R. *et al.* The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity.
 637 **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 189-212, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/andr.12165>.

638 FREITAS, T. *et al.* Prenatal exposure to a mixture of different phthalates increases the risk
 639 of mammary carcinogenesis in F1 female offspring. **Food And Chemical Toxicology**, v.
 640 156, p. 112519, out. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2021.112519>.

641 GALLAVAN, R. H. *et al.* Interpreting the toxicologic significance of alterations in
 642 anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body
 643 weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.

644 GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. Production, use, and fate of all plastics ever
 645 made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 2017. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.

646 GHASSABIAN, A. *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals and Child Health. **Annual**
 647 **Review Of Pharmacology And Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 573-594, 2022.
 648 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-021921-093352>.

649 GRISWOLD, M. D. 50 years of spermatogenesis: sertoli cells and their interactions with
 650 germ cells. **Biology Of Reproduction**, v. 99, n. 1, p. 87-100, 2018.
 651 <http://dx.doi.org/10.1093/biolre/ioy027>.

652 HANNAS, B. R. *et al.* Dose-Response Assessment of Fetal Testosterone Production and
 653 Gene Expression Levels in Rat Testes Following InUtero Exposure to Diethylhexyl
 654 Phthalate, Diisobutyl Phthalate, Diisoheptyl Phthalate, and Diisononyl Phthalate.
 655 **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 1, p. 206-216, 2011.
 656 <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr146>.

657 HARTMANN, N. B. *et al.* Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a
 658 Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. **Environmental Science &**
 659 **Technology**, v. 53, n. 3, p. 1039-1047, 2019. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.8b05297>

660 HEINRICH, A.; DEFALCO, T.. Essential roles of interstitial cells in testicular development
 661 and function. **Andrology**, v. 8, n. 4, p. 903-914, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/andr.12703>.

662 HUCKINS C.; CLERMONT Y. Evolution of gonocytes in the rat testis during late
 663 embryonic and early post-natal life. **Arch Anat Histol Embryol**. 1968;51(1):341-54. PMID:
 664 4905275.

665 IVELL, R. *et al.* Expression and Role of INSL3 in the Fetal Testis. **Frontiers In**
 666 **Endocrinology**, v. 13, p. 00-00, 2022. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.868313>.

667 JAIKUMAR, G. Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three
 668 cladocerans during chronic exposure. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 638-646, 2019.
 669 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.085>.

670 JENNER, L. C. Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR
 671 spectroscopy. **Science Of The Total Environment**, v. 831, p. 154907, 2022.
 672 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154907>.

673 JEWETT, E. *et al.* Microplastics and Their Impact on Reproduction—Can we Learn From
 674 the C. elegans Model? **Frontiers In Toxicology**, v. 4, 2022.
 675 <http://dx.doi.org/10.3389/ftox.2022.748912>.

676 JIN, H. *et al.* Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice.
 677 **Journal Of Hazardous Materials**, v. 401, p. 123430, 2021.
 678 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123430>.

679 JOENSEN, U. N. *et al.* Urinary excretion of phenols, parabens and benzophenones in
 680 young men: associations to reproductive hormones and semen quality are modified by
 681 mutations in the filaggrin gene. **Environment International**, v. 121, p. 365-374, 2018.
 682 10.1016/j.envint.2018.09.020

683 KATSIKANTAMI, I. *et al.* Phthalate metabolites concentrations in amniotic fluid and
 684 maternal urine: cumulative exposure and risk assessment. **Toxicology Reports**, v. 7, p.
 685 529-538, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.008>.

686 KAUR, G.; THOMPSON, L. A.; DUFOUR, J. M.. Sertoli cells – Immunological sentinels of
 687 spermatogenesis. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 30, p. 36-44, 2014.
 688 <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.011>.

689 KILCOYNE, K. R; MITCHELL, R. T. Effect of environmental and pharmaceutical
 690 exposures on fetal testis development and function: a systematic review of human
 691 experimental data. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 4, p. 397-421, 2019.
 692 <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmz004>.

693 KOOPMAN, P. *et al.* Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis
 694 differentiation. **Nature**, v. 348, n. 6300, p. 450-452, 1990.
 695 <http://dx.doi.org/10.1038/348450a0>.

696 LAWRENCE, B. M. *et al.* New Insights into Testosterone Biosynthesis: Novel Observations
 697 from HSD17B3 Deficient Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24,
 698 p. 15555–15555, dez. 2022.

699 LESLIE, H. A. *et al.* Discovery and quantification of plastic particle pollution in
 700 human blood. **Environment International**, v. 163, p. 107199, 2022.
 701 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>.

702 LI, H.; SPADE, D. J. Reproductive toxicology: environmental exposures, fetal testis
 703 development and function. **Reproduction**, v. 162, n. 5, p. 147-167, 2021.
 704 <http://dx.doi.org/10.1530/rep-20-0592>.

705 LI, L. *et al.* Hormone Regulation in Testicular Development and Function. **International**
 706 **Journal Of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 5805, 2024.
 707 <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25115805>.

708 LIN, H. *et al.* Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after
 709 exposure to phthalate *in utero*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n.
 710 20, p. 7218–7222, maio 2008.

711 LIN, H.-C. *et al.* Anatomical considerations, testicular, and scrotal anatomy of nonobstructive
 712 azoospermia patients. **Asian Journal of Andrology**, 14 fev. 2025.

713 LIU, Y. *et al.* Phthalate metabolites in breast milk from mothers in Southern China:
 714 occurrence, temporal trends, daily intake, and risk assessment. **Journal Of Hazardous**
 715 **Materials**, v. 464, p. 132895, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132895>.

716 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using
 717 Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408,
 718 dez. 2001. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

719 LUÍS, C. *et al.* Comprehensive Insight from Phthalates Occurrence: from health outcomes
 720 to emerging analytical approaches. **Toxics**, v. 9, n. 7, p. 157, 2021.
 721 <http://dx.doi.org/10.3390/toxics9070157>.

722 MA, T. *et al.* Effects of In Utero Exposure to Di-n-Butyl Phthalate on Testicular
 723 Development in Rat. **International Journal of Environmental Research and Public**
 724 **Health**, v. 14, n. 10, p. 1284, 24 out. 2017.

725 MAGRE, S.; JOST, A. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. **Journal of**
 726 **Electron Microscopy Technique**, v. 19, n. 2, p. 172–188, 1 out. 1991.

727 MITAL, P.; HINTON, B. T.; DUFOUR, J. M.. The Blood-Testis and Blood-Epididymis
 728 Barriers Are More than Just Their Tight Junctions1. **Biology Of Reproduction**, v. 84, n. 5, p.
 729 851-858, 2011. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.087452>.

730 MOHAN, D. *et al.* Degradation of Plastics Waste and Its Effects on Biological Ecosystems:
 731 A Scientific Analysis and Comprehensive Review. **Biomedical Materials and Devices**, 15
 732 maio 2023.

733 MURASHIMA, A. *et al.* Essential Roles of Androgen Signaling in Wolffian Duct
 734 Stabilization and Epididymal Cell Differentiation. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1640-
 735 1651, 2011. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-1121>.

736 NORTH, E. J.; HALDEN, R. U.. Plastics and environmental health: the road ahead.
 737 **Reviews On Environmental Health**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2013.
 738 <http://dx.doi.org/10.1515/reveh-2012-0030>.

739 OECD, **Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060**. 2022. Disponível em:
 740 <https://doi.org/10.1787/aa1edf33-en>. Acesso em: 01 out. 2025.

741 OJEDA SR, ADVIS JP, ANDREWS WW. Neuroendocrine control of the onset of puberty
 742 in the rat. **Fed Proc**. 1980 May 15;39(7):2365-71. PMID: 6989642.st

743 OLIVEIRA, C. W. L. *et al.* First evidence of microplastic accumulation in placentas and
 744 umbilical cords from pregnancies in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v.
 745 97Suppl 3, n. Suppl 3, p. e20241298, 2025.

746 ONU, United Nations Global Perspective Human. **Tratado global contra poluição**
 747 **plástica pode ficar pronto até 2024**. 2023. Disponível em:
 748 <https://news.un.org/pt/story/2023/02/1809202>. Acesso em: 01 out. 2025.

749 ORTH, J. M. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative
 750 autoradiographic study. **The Anatomical Record**, v. 203, n. 4, p. 485–492, ago. 1982.

751 O'DONNELL, L.; WHILEY, P. A. F.; LOVELAND, K. L.. Activin A and Sertoli Cells: key
 752 to fetal testis steroidogenesis. **Frontiers In Endocrinology**, v. 13, 2022.
 753 <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.898876>.

754 PARK, E.-J. et al. Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible
 755 implications on reproduction and development of the next generation. **Toxicology Letters**, v.
 756 324, p. 75–85, 15 maio 2020.

757 PICUT, C. A.; ZIEJEWSKI, M. K.; STANISLAUS, D. Comparative Aspects of Pre- and
 758 Postnatal Development of the Male Reproductive System. **Birth Defects Research**, v. 110,
 759 n. 3, p. 190-227, 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/bdr2.1133>.

760 PICUT, C. A. *et al.* Postnatal Development of the Testis in the Rat. **Toxicologic Pathology**,
 761 v. 43, n. 3, p. 326-342, 2014. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623314547279>.

762 PRATA, J. C. *et al.* Environmental exposure to microplastics: an overview on possible
 763 human health effects. **Science Of The Total Environment**, v. 702, p. 134455, 2020.
 764 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134455>.

765 PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland
 766 development. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 6, p. 641–659,
 767 2008.

768 PROKOP, J. *et al.* Transcriptional analysis of the multiple Sry genes and developmental
 769 program at the onset of testis differentiation in the rat. **Biology Of Sex Differences**, v. 11, n.
 770 1, 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s13293-020-00305-8>.

771 RAGUSA, A. *et al.* Plasticenta: first evidence of microplastics in human
 772 placenta. **Environment International**, v. 146, p. 106274, 2021.
 773 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>.

774 REBOURCET, D. *et al.* Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult
 775 Leydig cell development in the prepubertal testis. **Development**, v. 141, n. 10, p. 2139-2149,
 776 2014. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.107029>.

777 REHMAN, Z. U. *et al.* Role and mechanism of AMH in the regulation of Sertoli cells
 778 in mice. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 174, p.
 779 133-140, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.08.011>.

780 ROSENFELD, C. S.. Bisphenol A and phthalate endocrine disruption of parental and
 781 social behaviors. **Frontiers In Neuroscience**, v. 9, 2015.
 782 <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00057>.

783 ROUILLER-FABRE, V. *et al.* Development of the foetal and neonatal testis. **Andrologia**,
 784 v. 35, n. 1, p. 79-83, 2003. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0272.2003.00540.x>.

785 SANSONE, A. *et al.* AMH and INSL3 in testicular and extragonadal pathophysiology: what
 786 do we know?. **Andrology**, v. 7, n. 2, p. 131-138, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/andr.12597>.

787 SCARANO, W. R. *et al.* Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During
 788 Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome Modulation in
 789 Rats. **Toxicological Sciences**, v. 171, n. 1, p. 84-97, 2019.
 790 <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfz141>.

791 SCOTT, H. M.; MASON, J. I.; SHARPE, R. M. Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its
 792 Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 7, p.
 793 883–925, dez. 2009.

794 SEDHA S., KUMAR S., SHUKLA S. Role of Oxidative Stress in Male Reproductive
 795 Dysfunctions with Reference to Phthalate Compounds. **Urol J**, v. 12, n.5, 2015 PMID:
 796 26571312.

797 SEKARAN, S.; JAGADEESAN, A. In Utero Exposure to Phthalate Downregulates
 798 Critical Genes in Leydig Cells of F1 Male Progeny. **Journal Of Cellular Biochemistry**,
 799 v. 116, n. 7, p. 1466-1477, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.25108>.

800 SERRANO, S. E. et al. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and
 801 epidemiology data. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, 2 jun. 2014.

802 SIFAKIS, S. *et al.* Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male
 803 and female reproductive systems. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 51,
 804 p. 56-70, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>.

805 SKAKKEBAEK, N. E. *et al.* Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: influences
 806 of environment and genetic susceptibility. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 55-97,
 807 2016. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00017.2015>.

808 SMITH, L. B.; WALKER, W. H.. The regulation of spermatogenesis by androgens.
 809 **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 30, p. 2-13, 2014.
 810 <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>.

811 SONG, Y. K. *et al.* Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion
 812 on Microplastic Fragmentation by Polymer Type. **Environmental Science & Technology**,
 813 v. 51, n. 8, p. 4368-4376, 2017. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b06155>.

814 STANTON, P. G.. Regulation of the blood-testis barrier. **Seminars In Cell &**
 815 **Developmental Biology**, v. 59, p. 166-173, 2016.
 816 <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.018>.

817 SVECHNIKOV, K. *et al.* Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. **Journal**
 818 **Of Biomedicine And Biotechnology**, v. 2010, p. 1-10, 2010.
 819 <http://dx.doi.org/10.1155/2010/684504>.

820 TETRO, N. *et al.* The Placental Barrier: the gate and the fate in drug
 821 distribution. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 4, 2018.
 822 <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-017-2286-0>.

823 ULLAH, S. *et al.* A review of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and
 824 their associated chemicals in mammals. **Frontiers In Endocrinology**, v. 13, 2023.
 825 <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.1084236>.

826 VETHAAK, A. D.; LEGLER, J. Microplastics and human health. **Science**, v. 371, n. 6530,
 827 p. 672-674, 2021. <http://dx.doi.org/10.1126/science.abe5041>.

828 VILAMAIOR, P. S.L.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F.. Postnatal growth of the
 829 ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. **The Anatomical**
 830 **Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288,
 831 n. 8, p. 885-892, jul. 2006. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.a.20363>.

832 VILLACORTA, A. *et al.* A new source of representative secondary PET nanoplastics.
 833 Obtention, characterization, and hazard evaluation. **Journal Of Hazardous Materials**, v.
 834 439, p. 129593, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129593>.

835 WANG, J. *et al.* Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces prepubertal testicular injury through
836 MAM-related mitochondrial calcium overload in Leydig and Sertoli cell apoptosis.
837 **Toxicology**, v. 509, p. 153956, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2024.153956>.

838 WATKINS, D. J. *et al.* In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in
839 relation to female sexual maturation. **Environmental Research**, v. 134, p. 233-241, 2014.
840 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.010>.

841 WILSON, V. S. *et al.* Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with
842 reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. **Toxicology Letters**, v. 146, n. 3, p.
843 207–215, fev. 2004.

844 WRIGHT, S. L.; KELLY, F. J.. Plastic and Human Health: a micro issue?..
845 **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 12, p. 6634-6647, 2017.
846 <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>.

847 WU, P. *et al.* Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics.
848 **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 184, p. 109612, 2019.
849 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109612>.

850 XI, W. *et al.* Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate
851 on gonadal development of male mice. **Environmental Science and Pollution Research**,
852 v. 19, n. 7, p. 2515–2527, jul. 2012.

853 XIAO, Y. *et al.* Research progress on Sertoli cell secretion during spermatogenesis.
854 **Frontiers In Endocrinology**, v. 15, 2025. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2024.1456410>.

855 XU, E. G. *et al.* Primary and Secondary Plastic Particles Exhibit Limited Acute Toxicity but
856 Chronic Effects on *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 11, p.
857 6859-6868, 2020. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.0c00245>.

858 YE, L. *et al.* Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem
859 Leydig Cells. **Frontiers In Physiology**, v. 8, 2017.
860 <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2017.00430>.

861 YESILDEMIR, O; CELIK, M. N. Association between pre- and postnatal exposure to
862 endocrine-disrupting chemicals and birth and neurodevelopmental outcomes: an extensive
863 review. **Clinical And Experimental Pediatrics**, v. 67, n. 7, p. 328-346, 2024.
864 <http://dx.doi.org/10.3345/cep.2023.00941>.

865 YONG, C.; VALIYAVEETIL, S.; TANG, B. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics
866 in Mammalian Systems. **International Journal Of Environmental Research And Public
867 Health**, v. 17, n. 5, p. 1509, fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17051509>.

868 YOON, K. *et al.* Estrogenic Endocrine-Disrupting Chemicals: Molecular Mechanisms of
869 Actions on Putative Human Diseases. **Journal of Toxicology and Environmental Health**,
870 Part B, v. 17, n. 3, p. 127–174, 3 abr. 2014.

871 ZHOU, C.; GAO, L.; FLAWS, J. A.. Prenatal exposure to an environmentally relevant
872 phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. **Toxicology And Applied
873 Pharmacology**, v. 318, p. 49-57, mar.
874 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2017.01.010>.